

Disciplina de histologie (cond.: prof. dr. Gh. Roșca, doctor în medicină)  
a I.M.F. din Tirgu-Mureș

## STUDIUL CROMOZOMILOR LA ȘOBOLANII WISTAR DUPA ADMINISTRAREA CORYL-ALUMINIU-POLIFENOLATULUI

Gh. Roșca, Stela Roșca, Angela Szövérfy, C. Csedő, L. Ștef

Prezenta lucrare reprezintă contribuția adusă de colectivul disciplinei noastre la realizarea temei de cercetare a facultății de farmacie (contractată cu Întreprinderea de Produse Cosmetice „Farmec” din Cluj-Napoca), având ca titlu: Testarea acțiunii farmacotoxicologice și fitochimice a coryl-aluminiu-polifenolatului, o substanță de bază în realizarea unor produse cosmetice, pe bază de extracte vegetale, sub formă de compuși metalici.

### Ipoteza de lucru

În lucrarea noastră, ne-am propus să urmărim prin tehnici citogenetice, acțiunea coryl-aluminiu-polifenolatului asupra cromozomilor de șobolani, administrând substanța testată, zilnic timp de două săptămâni, în doze de 1% și, respectiv, 5% din  $DL_{50}$ .

### Material și metoda

Conform ipotezei de lucru, am ales 30 de șobolani Wistar, tineri, de ambele sexe, cu o greutate corporală cuprinsă între 50 și 85 g, proveniți de la biobaza I.M.F. Tirgu-Mureș, pe care i-am împărțit în 3 loturi:

a) *Lotul martor*, format din 10 șobolani, care au fost îngrijiți și hrăniți în cadrul biobazei; lotul a cuprins 5 masculi (sublotul MM) și 5 femele (sublotul MF).

b) *Lotul C—1*, alcătuit din 10 șobolani, 5 masculi (sublotul CM—1) și 5 femele (sublotul CF—1) la care s-a administrat zilnic pe cale bucală (cu pipete) sol. de coryl-aluminiu-polifenolat în concentrație de 1% din  $DL_{50}$ .

c) *Lotul C—5*, format din 10 șobolani, 5 masculi (sublotul CM—5) și 5 femele (sublotul CF—5), la care s-a administrat, în aceleași condiții, tot 5 săptămâni, sol. coryl-aluminiu-polifenolat, dar în doză mai mare, de 5% din  $DL_{50}$ .

La 24 ore după ultima administrare a substanței testate, animalele au fost sacrificate. Pentru studiile citogenetice șobolanilor din cele 3 loturi li s-a administrat, cu 2,5 ore înainte de sacrificare, pe cale intra-

peritoneală, cite 0,5 ml la 100 g greutate animal, din soluția de colchicină (Serva) 0,025% (diluția s-a făcut în apă distilată).

Tehnica de prelucrare a materialului a avut la bază metoda descrisă de E.H.R. Ford și D.H.M. Wolliam (vezi Citogenetica de P. Raicu și colab. 1974, p. 251).

Colorarea metafazelor s-a făcut cu sol. Giemsa proaspăt diluată, în proporție de 5-40 cc, timp de 20 minute.

Materialul utilizat pentru studiul cariologic a fost măduva roșie hematogenă prelevată din oasele femurale. De la fiecare animal de experiență s-au întins 5 frotiuri care, după colorare, au fost examinate la microscopul cu imersie și microfotografiate. S-au citit și înregistrat pe tablele, de la fiecare animal, un număr de 35-45 metafaze.

### Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în experiment au fost evaluate deopotrivă, atât la examenul microscopic cu obiectiv de imersie, cât și pe microfotografiile executate în acest scop.

S-au urmărit două grupe de aberații cromozomiale:

1. Aberațiile cromozomiale de număr, sub forma aneuploidiilor de tip hipoploid și de tip hiperploid;

2. Aberațiile cromozomiale de structură, sub forma leziunilor acromatice, rupturilor cromatidice, delețiilor terminale, fragmentelor cromatidice acentrice.

Am ales în testarea noastră doar anomaliile cromozomiale care pot fi recunoscute la microscop cu mare siguranță, eliminând metafazele cu cromozomii contractați, filiformi, despiralizați, pufoși sau aglutinați pe care unii cercetători îi consideră drept cromozomi markeri (Nadeer Wang-kong și colab.), alții și împreună cu noi socotim aceste aspecte, drept rezultate induse de factorii tehnici din manopera utilizată. Aproape pe fiecare frotiu și uneori chiar pe același câmp optic am găsit alături de metafaze cu aspect normal (cromozomi cu suprafață netedă și uniform etalați), una sau două metafaze cu suprafața cromozomilor modificată.

Toate rezultatele au fost trecute pe tablele și grafice.

a) La lotul martor (M), marea majoritate a metafazelor 87,92% (313) au fost normoploide, formate din 42 de cromozomi. Din 356 metafaze citite numai 43 (12,086%) sînt aneuploide, 39 hipoploidii (10,96%) și 4 hiperploidii (1,12%). Dintre metafazele hipoploide predomină evident, celulele cu pierderi minime de 1 cromozom (17) în procent de 4,77% și 2 cromozomi (13) în procent de 3,65% din totalul metafazelor examinate. Am găsit numai 4 forme de hiperploidii, fiecare cu 1 cromozom supra-numerar (1,12%).

Dacă urmărim aberațiile cromozomiale de număr la cele două subloturi, observăm că aneuploidiile sînt ceva mai crescute la masculi (MM — 14,37%), față de sublotul femel (MF — 9,89%), dar formele de hipoploidii sînt acele predominînd, cele cu pierderi minime de cromozomi (MF — 9,34%; MM — 13%) (fig. nr. 1).

Aberațiile cromozomiale de structură, la animalele lotului martor au fost prezente în următorul procent: 99,49% cromozomi cu structură normală; 0,51% cromozomi cu anomalii de structură, dintre care delețiile

au atins un procent de 0.18% (27); leziunile acromatice 0.16 (24); rupturile cromatidice 0,07<sup>0</sup> (11 cromozomi), fragmentele acentrice 0.08<sup>0</sup> (12). La cele două subloturi procentul anomaliilor cromozomiale de structură este foarte apropiat (MM — 0.54<sup>0</sup>; MF — 0.48%). doar că pe primul loc de frecvență la femele sînt delețiile (0,2<sup>0</sup>), în timp ce la masculi leziunile acromatice (0.17<sup>0</sup>) și delețiile (0.16%).

Toate aceste date cifrice și procentuale găsite la lotul martor și analiza lor pe tipuri de aberații și sexe (fig. nr. 1 și 2) ne permit să aflăm că modificările de număr și structură cromozomială sînt minime și ca atare fără semnificație deosebită, astfel că aceste date pot fi utilizate ca cifre de referință în cercetarea noastră. Astfel de procente pînă la 10% noi le-am găsit și la șobolanii martori proveniți de la biobaza IMF Cluj-Napoca și ca atare ele pot fi considerate fie ca o consecință a unor aberații spontane, posibile și descrise și de alți autori (*De Curtis*), fie consecința unor artefacte provocate însăși de factorii tehnici utilizați (colchicinizare, hipotonizare, fixare, etalare etc.), după cum susțin mulți autori (*Grepberg* — 1964; *Migeon* — 1964; *Mertz* — 1964 și *Wiener* — 1965). Aceste considerente sînt valabile la ambele grupe de aberații cromozomiale: de număr și de structură.

b) La *Lotul C-1*, din 410 metafaze citite, majoritatea, 87,56<sup>0</sup>, sînt normale numeric, numai 12,44% (51) prezintă modificări de număr, din care o singură celulă are un cromozom în plus (0,24<sup>0</sup>) și 12,19% (50) metafaze prezintă hipoploidii. Dintre aneuploidiile hipoploide predomină evident celulele cu pierderi minime de 1 cromozom (5,37%).

Dacă analizăm comparativ procentul aberațiilor cromozomiale de număr la cele două subloturi, observăm că la femele numărul metafazelor aneuploide este de două ori mai mare față de sublotul mascul (*CF-5=16.18<sup>0</sup>*; *CM-5=8.73%*) (fig. nr. 1).

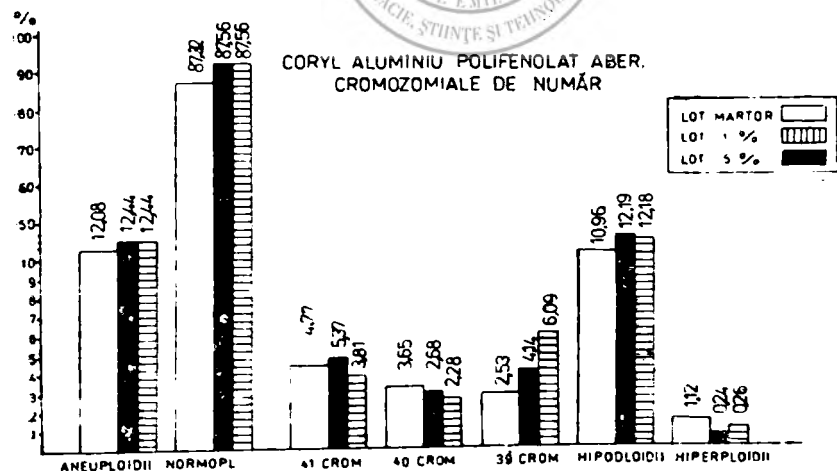


Fig. nr. 1

Cromozomii cu anomalii de structură ating un procent de 0,61% și sînt reprezentați în ordinea frecvenței de; 1. deleții 0,25% (42); 2. leziuni acromatice 0,16% (28); 3. rupturi cromatidice 0,13% (23); 4. fragmente acentrice 0,06% (10). Dacă comparăm aceleași procente și tipuri de aberațiuni structurale la cele două subloturi atunci constatăm aceeași ordine de frecvență dar procente ușor crescute la sublotul mascul (CM—1), (fig. nr. 2).

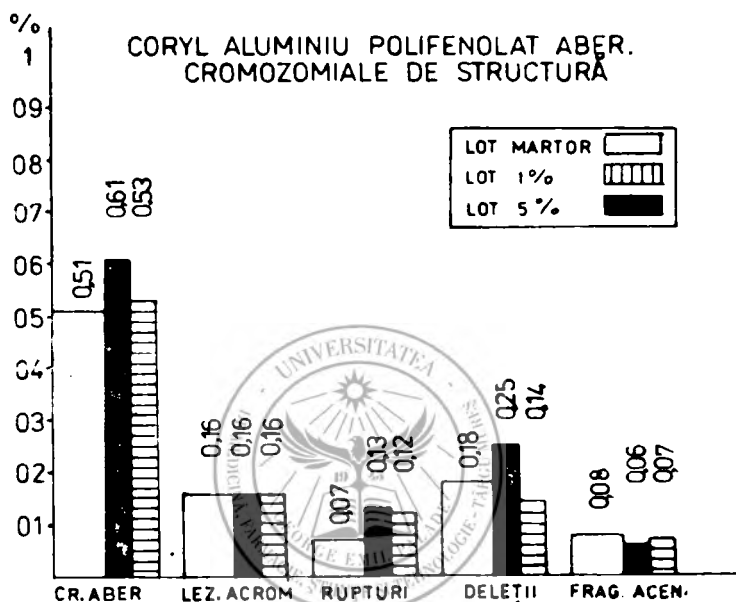


Fig. nr. 2

c. La lotul C—5, din cele 394 metafaze examinate la microscopul cu imersie, 87,56% (345) prezintă 42 de cromozomi și numai în 49 celule am găsit metafaze modificate numeric (12,44%), 48 metafaze fiind hipoploide (12,18%) și numai o singură metafază de tip hiperploid (0,26%). Din totalul metafazelor hipoploide predomină celulele cu pierderi minime de 1 (3,81%) și 2 cromozomi (2,28%). Dintre hiperploidiile am găsit o singură metafază cu un cromozom supranumerar.

Dacă comparăm cele două subloturi femel și mascul din lotul C—5, rezultatele obținute arată procente generale asemănătoare, astfel: la sublotul CF—5 metafazele normoploide ating un procent de 88,21% (172 celule) iar la sublotul CB—5 un procent de 86,93% (172 celule). La sublotul femel metafazele hipoploide sînt în număr de 22 (realizînd un procent de 11,28%, dar în acest procent predomină evident celulele din care lipsește un singur cromozom (11 celule — 5,64%) în timp ce hipoploidiile cu pierderea a 2 cromozomi este prezentă doar într-o singură celulă (1 celulă = 0,51%).

La sublotul mascul (CB—5) din cele 26 de celule hipoploide (13,07%) predomină metafazele cu pierderi de 2 cromozomi dintr-o celulă (8-metafaze = 4,02%) în timp ce metafazele cu un singur cromozom în minus ating un procent mai scăzut (4 celule = 2,01%). Cele arătate mai sus dovedesc că în ambele subloturi există aproape același procent de hipoploidii dar diferă tipul de hipoploidie astfel că la sublotul CF—5 predomină hipoploidiile cu pierderea a 2 cromozomi dintr-o celulă, pe când în sublotul CB—5 predomină hipoploidiile cu pierderea unui singur cromozom dintr-o celulă, (fig. nr. 1).

În domeniul hiperploidiilor datele obținute de noi sînt nesemnificative, fiind vorba doar de o singură celulă cu un cromozom în plus care la sublotul CF—5 lipsește.

În ceea ce privește aberațiile cromozomiale de structură studiul nostru citogenetic a evidențiat la lotul C—5 un număr de 87 (0,53%) cromozomi cu anomalii de structură din care în ordinea frecvenței (au fost reprezentate toate tipurile descrise și la loturile anterioare) sînt următoarele: 1. leziunile acromatice în număr de 26 (0,16%); 2. delețiile în număr de 23 (0,14%); 3. rupturile cromatidice în număr de 20 (0,12%); 4. fragmentele acentrice în număr de 12 (0,07%) fig. nr. 2.)

Comparînd rezultatele la cele 2 subloturi, constatăm aceleași tipuri de aberații cromozomiale dar într-un procent ușor modificat: la sublotul CF—5 procentul anomaliilor cromozomiale este 0,57% în timp ce la sublotul CB—5 procentul este ușor mai scăzut, de 0,48%.

Ordinea de frecvență a leziunilor acromatice, delețiilor și a rupturilor cromatidice diferă în cele două subloturi, astfel: leziunile acromatice și rupturile se află pe primul loc, atingînd ambele un procent de reprezentare de 0,14% (12 cromozomi): la sublotul mascul (CB—5) delețiile ating un procent mai mic de numai 0,13%. În comparație cu aceste date, la sublotul femel (CF—5) leziunile acromatice sînt pe primul plan și ating un procent de 0,17%, fiind urmate apoi de deleții (0,16%), în timp ce rupturile cromatidice se află pe locul 3 cu un procent de 0,1%. Aceste mici diferențe procentuale fiind însă de ordinul sutimilor nu au o semnificație aparte în testul nostru.

Comparînd în final datele procentuale ale aberațiilor cromozomiale la cele 3 loturi din experimentul nostru (M, C—1 și C—2 rezultatele obținute arată următoarele aspecte:

— numărul celulelor normoploide și numărul celulelor aneuploide cu setul cromozomial modificat numeric, ating procente foarte apropiate la loturile tratate cu coryl-aluminiu-polifenolat, indiferent de dozele administrate în experimentul nostru (la lotul C—1 celulele normoploide = 87,56%; celule aneuploide = 12,44%; la lotul C—5 celule normoploide = 87,56%; celule aneuploide = 12,44%), aceste date fiind asemănătoare cu cifrele găsite și la lotul martor (celule normoploide = 87,92%; celule aneuploide = 12,08%).

— numărul total al cromozomilor cu aberații de structură este ușor crescut, la animalele tratate cu coryl-aluminiu-polifenolat față de lotul martor: M—0,51%; C—1—0,61% și C—5—0,53%.

Diferența minimă dintre lotul martor și loturile tratate, precum și faptul că la animalele tratate cu doze mai concentrate din soluția testată (5% din DL<sub>50</sub>) aceste anomalii de structură cromozomială ating un pro-

cent mai mic decât la animalele lotului C—1 care au primit doar 1% din DL<sub>50</sub>, dovedesc lipsa de nocivitate a coryl-aluminiu-polifenolatului asupra cromozomilor de șobolani.

Față de lotul martor numai aberațiile cromozomiale de structură de tipul rupturilor cromatidice sînt într-un număr mai mare (C—1=0,13%; C—5=0,12%) la animalele tratate cu coryl-aluminiu-polifenolat (M=0,07%). În timp ce leziunile acromatice ating același procent la toate 3 loturile (martor și testate), iar fragmentele acentrice ating cifre chiar mai mici decît la lotul martor (C—1 = 0,06%; C—5 = 0,07%; M = 0,08%). Delețiile fiind mai scăzute la lotul C—5 (0,14%) decît la lotul C—1 (0,25%), iar procentul mediu al loturilor testate fiind mai mic (0,145%) decît procentul delețiilor la lotul martor (0,18%) dovedesc aceeași lipsă de nocivitate a coryl-aluminiu-polifenolatului asupra cromozomilor de șobolani.

### Concluzii

Studiul nostru experimental efectuat pe 3 loturi de șobolani: un lot martor de referință (LM), două loturi de animale la care s-a administrat coryl-aluminiu-polifenolat în doze diferite: C—1 (1% din DL<sub>50</sub>) și C—5 (5% din DL<sub>50</sub>), prin rezultatele obținute la examenul cariologic (citogenetic) putem trage următoarele concluzii:

1. Coryl-aluminiu-polifenolatul administrat în doze de 1% și 5% din DL<sub>50</sub> nu induce modificări cromozomiale.

2. Nici anomaliile cromozomiale de număr și nici anomaliile cromozomiale de structură nu le-am găsit în procente mai ridicate și cu semnificație patologică la animalele testate (tratate cu coryl-aluminiu-polifenolat) în comparație cu animalele de referință din lotul martor.